

РАСПРЕДЕЛЕННАЯ МОДЕЛЬ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ДИНАМИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЛАЗМИД

В.В. Ганусов¹, А.В. Брильков²

¹Красноярск, Красноярский государственный университет, пр. Свободный 79, 660041.

²Красноярск, Институт биофизики СО РАН, Академгородок, 660036.

Email: ¹vganuso@emory.edu, ²bril@ibp.krasnoyarsk.su

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, код проекта 97-04-499.

В работе разработана новая математическая модель, описывающая динамику распределения клеток микробной популяции с различным числом копий плазмид при непрерывном культивировании в хемостате. В приближении стационарного роста в непрерывной культуре получено, что снижение средней копийности в популяции бактерий является экспоненциальным, причем ненулевая “стоимость” плазмиды приводит к большей скорости элиминации плазмид (тоже экспоненциальной). На основе модели предложена новая характеристика популяционной устойчивости рекомбинантных штаммов микроорганизмов – время полуэлиминации плазмид, определяемое временем генерации, скоростью потери плазмид и селективным коэффициентом. Впервые объяснен эффект снижения селективного преимущества бесплазмидных клеток при длительном культивировании рекомбинантного штамма в хемостате, связанного по модели со снижением среднего числа копий плазмиды в микробной популяции.

ВВЕДЕНИЕ

Плазмиды – это молекулы ДНК, существующая и реплицирующая независимо от бактериальной хромосомы, находящаяся в клетках-хозяевах. Плазмиды обычно представляют собой относительно небольшие (по сравнению с хромосомальной ДНК) кольцевые молекулы с молекулярной массой порядка 10^6 - 10^8 дальтон (Summers, 1996). В большинстве случаев плазмидная ДНК составляет около 0.1% от полного количества клеточной ДНК, причем плазмиды часто представлены в бактериальной клетке в

нескольких копиях (от 1 плазмиды на клетку до тысячи), также называемой копийностью.

В нормальных условиях жизнедеятельности микроорганизмов плазмиды не выполняют каких-либо существенных функций, зачастую снижая скорость роста микробной популяции, но в то же время в специфических условиях могут обеспечить клетку рядом полезных качеств. Установлено, например, что плазмиды, называемые *R*-факторами (факторами устойчивости), обуславливают устойчивость бактерий к антибиотикам, а *D*-плазмиды (или плазмиды биodeградации) кодируют ряд ферментов, обеспечивающих расщепление тяжелых углеводов (Печуркин и др., 1990; Щелкунов, 1987; Боронин и др., 1985).

В многочисленных экспериментальных исследованиях было обнаружено, что довольно часто длительное культивирование плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов приводит к элиминации рекомбинантных клеток и замене их на бесплазмидные варианты. Такого рода популяционная неустойчивость штаммов микроорганизмов, содержащих рекомбинантные плазмиды (плазмиды, измененные методами генной инженерии), обусловлена тремя основными причинами (Вельков, 1983, Печуркин и др., 1990; Щелкунов, 1987): 1) сегрегацией плазмид, когда часть клеток популяции утрачивает плазмиды при делении; 2) нестабильностью генетической структуры плазмид, при которой плазмиды сохраняются в популяции, но в измененном виде; 3) отличием кинетических характеристик роста популяции штамма, содержащего активно функционирующие плазмиды, в сравнении с аналогичными у бесплазмидного штамма, либо у штамма, содержащего измененные плазмиды.

Сегрегационная (репликационная) нестабильность плазмид обычно обусловлена отсутствием (или нарушением) в векторах генов, ответственных за автономную репликацию плазмид (снижение эффективности контроля копийности); отсутствием системы, способствующей расщеплению мультимеров в клетке (например, система *cer-XerD* плазмиды ColE1, (Summers, 1998; Summers *et al.*, 1985; Summers & Sherratt, 1984)); отсутствие механизмов точного распределения плазмидных копий между дочерними клетками при делении материнской и ряд других (Summers, 1996). В моделях этот тип нестабильности характеризуется вероятностью образования бесплазмидной клетки при делении плазмидсодержащего варианта τ_0 (Stewart & Levin, 1977).

Нестабильность генетической структуры плазмид обусловлена спонтанными изменениями их генетической структуры, например, точечными заменами нуклеотидов, делециями, дупликациями, встройками *IS*-элементов и транспозонов и т.д. Иногда штаммы с измененными плазмидами имеют селективное преимущество по сравнению с исходным вариантом, что однако зависит от условий роста популяции, типа ограничения пищевых потребностей, характера изменений в структуре плазмид и др. (Godwin & Slater, 1979; Вельков, 1983).

Кинетическая неустойчивость плазмидных штаммов микроорганизмов обусловлена снижением удельной скорости роста популяции, содержащей рекомбинантные плазмиды, по сравнению с изогенным бесплазмидным вариантом (Zund & Lebek, 1980). Наиболее вероятной причиной этого эффекта является отвлечение биосинтетического аппарата клеток на обеспечение плазмидных функций, либо непосредственное торможение скорости роста продуктами плазмидных генов. Обычно этот тип нестабильности характеризуется селективным коэффициентом (также называемым селективным преимуществом бесплазмидных клеток, “стоимостью” плазмиды) $\alpha = 1 - \mu^+ / \mu^-$, где μ^+ и μ^- - удельные скорости роста плазмидных и бесплазмидных клеток (Stewart & Levin, 1977; Levin & Stewart, 1977; Печуркин и др., 1990; Брильков и др., 1990). Очевидно, что положительные значения α означают, что плазмиды обуславливают дополнительную метаболическую нагрузку на клетку-хозяина, так что скорость роста плазмидного штамма меньше, чем бесплазмидного варианта. В селективных же для поддержания плазмид условиях, селективный коэффициент может достигать бесконечно больших (негативных) значений при отсутствии роста бесплазмидных клеток ($\mu^- \rightarrow 0$).

В данной работе мы рассмотрим особенности популяционной динамики рекомбинантных штаммов микроорганизмов, содержащих многокопийные сегрегационно и кинетически нестабильные плазмиды.

ФОРМУЛИРОВКА РАСПРЕДЕЛЕННОЙ МОДЕЛИ

Рассмотрим изменение численности под-популяции (в общей популяции плазмиднесущих бактерий), в которой каждая клетка содержит точно i копий плазмиды. Обозначим значение плотности (например, число клеток в мл) этой суб-

популяции в момент времени t как $X_i(t)$. В следующий бесконечно близкий момент времени $t + dt$ с клетками этой под-популяции может произойти три основных события (см. рис. 1). Во-первых, благодаря негативному контролю копийности, число копий в клетках может возрасти до $i+1$, что определяется скоростью репликации плазмид λ_i , очевидно зависящей от числа копий плазмиды в под-популяции. Во-вторых, клетки популяции могут поделиться в интервал времени $(t, t + dt)$, что может привести к образованию бесплазмидной клетки с вероятностью $\tau_0(i)$. В третьих, благодаря тому, что часть клеток суб-популяции делится в интервал времени $(t, t + dt)$, число копий плазмиды в клетках снижается за счет процесса “деление - случайное распределение плазмиды“ (в среднем) с удельной скоростью $\tau_i \mu_i$ (рис. 1).

Рис. 1 где-то здесь

Необходимо подчеркнуть, что описанный процесс наследования плазмид в микробной популяции (рис. 1) является приближенным, т.к. он не описывает подробно, как происходит сегрегация (и вообще-то репликация) плазмид. Напротив, мы заменяем, например, точный процесс сегрегации плазмид на приближенный: снижение (в среднем) копийности при случайном распределении, что, впрочем, может быть проинтерпретировано как “разбавление” плазмид пропорционально их количеству (поэтому $\tau_i = \tau \cdot i$). Этим свойством обладает и динамика средних (не показано).

Суммируя все вышесказанное и используя схему, приведенную на рис. 1, дискретная математическая модель, описывающая динамику рекомбинантных штаммов микроорганизмов, содержащих нестабильные многокопийные плазмиды, при культивировании в хемостате принимает вид:

$$\begin{cases} \frac{dX_0}{dt} = (\mu_0(S) - D)X_0 + \tau\mu_1(S)X_1 + \sum_{i=1}^N \tau_0(i)\mu_i(S)X_i, \\ \frac{dX_i}{dt} = (\mu_i(S) - D)X_i - (\tau i \mu_i(S) + \lambda_i)X_i + \tau(i+1)\mu_{i+1}(S)X_{i+1} + \lambda_{i-1}X_{i-1}, \quad i = 1, 2, \dots, N, \\ X_{N+1} = 0, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \sum_{i=0}^N \frac{\mu_i(S)X_i}{y_i}, \end{cases} \quad (1)$$

где X_i - концентрация клеток микроорганизмов с i копиями плазмиды, $\mu_i(S)$ - удельная скорость роста суб-популяции микроорганизмов с копийностью i , D - удельная скорость разбавления среды в хемостате, S - концентрация субстрата в ферментере, S_0 - концентрация субстрата в питающем резервуаре, y_i - экономический коэффициент, λ_i - скорость репликации плазмид, τ - параметр, определяющий скорость уменьшения среднего числа копий на клетку в популяции микроорганизмов, N - максимально возможное количество копий плазмиды в клетке (которое в частности может быть и бесконечным).

Система уравнений (1) очевидно представляет собой разностную схему по переменной “ i ”, где шаг равен единице. Определяя относительную копийность как $x = i/N$ и предполагая, что изменение относительной копийности за время dt мало ($dx = 1/N \ll 1$), с помощью простейшей замены переменных приходим к непрерывной модели:

$$\frac{\partial F(x, t)}{\partial t} = (\mu(x, S) - D)F(x, t) + \frac{\partial}{\partial x} [(\tau x \mu(x, S) - \lambda(x))F(x, t)], \quad (2)$$

где $F(x, t)$ - плотность клеток с относительным числом копий плазмиды “ x ”, $\mu(x, S)$ - удельная скорость роста популяции. Дополняя уравнение (2) уравнением для лимитирующего рост субстрата, получаем систему интегрально-дифференциальных уравнений, описывающих динамику численности многокопийных рекомбинантных плазмид в популяции бактерий:

$$\begin{cases} \frac{\partial F(x, t)}{\partial t} = (\mu(x, S) - D)F(x, t) + \frac{\partial}{\partial x} [(\tau x \mu(x, S) - \lambda(x)) \cdot F(x, t)], \\ \frac{\partial F(0, t)}{\partial t} = (\mu(0, S) - D)F(0, t) + \tau \mu(0, S)F(0, t) + \int_0^1 \tau_0(x) \mu(x, S) F(x, t) dx, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \int_0^1 \rho(x) \frac{\mu(x, S) F(x, t)}{y(x, S)} dx. \end{cases} \quad (3)$$

где удельная скорость роста популяции микроорганизмов $\mu(x, S)$ записывается в общем случае в виде, предложенном Моно (Monod, 1949):

$$\mu(x, S) = \mu_s = \frac{\mu_{\max}(x) \cdot S}{K_s(x) + S}, \quad (4)$$

где $\mu_{\max}(x)$ и $K_s(x)$ - максимальная удельная скорость роста микробной популяции и константа полунасыщения, которые в общем случае зависят от числа копий плазмиды в клетках микроорганизмов.

ВЫВОД МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ С ПОЗИЦИЙ УРАВНЕНИЯ НЕПРЕРЫВНОСТИ

Обобщенный вид математической модели (3) в случае популяционной динамики микроорганизмов, содержащих несколько плазмид разного типа, можно получить, используя законы сохранения. Для этого рассмотрим динамику популяции микроорганизмов при непрерывном культивировании в хемостате. Предполагая пространственную гомогенность популяции бактерий и питающего их субстрата, изменение численности микроорганизмов F и ресурса S подчиняется следующей системе дифференциальных уравнений (Herbert et al., 1965; Moser, 1958; Novick & Szilard, 1950; Pirt, 1975):

$$\begin{cases} \frac{dF}{dt} = [\mu(S) - D]F, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu(S)F}{y}, \end{cases} \quad (5)$$

где $\mu(S)$ - удельная скорость роста популяции микроорганизмов, D - удельная скорость разбавления среды в хемостате и F - плотность микробной популяции.

Предположим теперь, что клетки популяции распределены по каким-либо признакам, например, возрасту, размеру или числу копий некоторой плазмиды. Тогда функция $F = F(\vec{x}, t)$ теперь имеет смысл плотности вероятности так, что

$F(\vec{x}, t) d\vec{x} / \int_0^{\infty} F(\vec{x}, t) d\vec{x}$ - есть вероятность обнаружения клетки с относительной

копийностью, принадлежащей интервалу $(\vec{x}, \vec{x} + d\vec{x})$, где \vec{x} - относительное содержание

плазмидной ДНК в клетке. В этом случае, так как F является функцией как минимум двух переменных, уравнение (5) должно быть переписано в частных производных (Ганусов и др., 1999; Ганусов и Брильков, 1999; Ландау и Лифшиц, 1973; Климонтович, 1982).

Для вывода модели в частных производных выпишем закон сохранения числа клеток для некоторой произвольной области фазового пространства $dV = d^n \bar{x}$ (“фазовое пространство” в этом контексте означает наличие нескольких (n) различных плазмид с разной копийностью). Учтем, что кроме потока через границы, вызванного изменением копийности клеток со временем, существуют процессы рождения и элиминации клеток, которые можно рассматривать как источники $\mu(\bar{x}, S)$ и стоки D , распределенные по всей рассматриваемой области V . К моменту времени t в рассматриваемом объеме фазового пространства V будет $\int_V F d^n \bar{x}$ клеток. Рождение и элиминация даются следующим интегралом:

$$\int_0^t \int_V [\mu(\bar{x}, S) - D] d^n \bar{x} dt.$$

Дифференцируя по t , получаем закон сохранения полного числа бактериальных клеток (Ландау и Лифшиц, 1973):

$$\frac{d}{dt} \int_V F d^n \bar{x} = \int_V [\mu(\bar{x}, S) - D] d^n \bar{x}.$$

Перенос операции дифференцирования под знак интеграла дает следующий закон:

$$\int_V \frac{\partial F}{\partial t} d^n \bar{x} + \oint_S (F \bar{v}) d\bar{s} = \int_V [\mu(\bar{x}, S) - D] d^n \bar{x},$$

где $\bar{v} = \bar{v}(x, t)$ - скорость передачи плазмид в популяции от варианта \bar{x} варианту $\bar{x} + d^n \bar{x}$. Пользуясь теоремой Гаусса-Остроградского (Ландау и Лифшиц, 1973) и переходя к дифференциальной форме, мы получаем:

$$\frac{\partial F}{\partial t} + \operatorname{div}(\dot{x}F) = [\mu(x, S) - D]F.$$

Вместе с уравнением на субстрат в случае хемостатного культивирования общая математическая модель, описывающая динамику распределения плазмид в клетках микроорганизмов, имеет следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{\partial F(\bar{x}, t)}{\partial t} + \operatorname{div}(\dot{x}F(\bar{x}, t)) &= (\mu(\bar{x}, S) - D) \cdot F(\bar{x}, t), \\ \frac{dS}{dt} &= D(S - S_0) - \int_0^\infty \frac{\mu(\bar{x}, S)F(\bar{x}, t)}{y(\bar{x}, S)} d^n \bar{x}. \end{aligned} \quad (6)$$

Из общей модели (6) при определенных предположениях следует непрерывная модель (3), описывающая сегрегационную и кинетическую нестабильность плазмид микроорганизмов, для чего необходимо знание двух основных функций: $v = v(\bar{x}, t)$ и $\mu = \mu(\bar{x}, S)$. Тогда как удельная скорость роста микробной популяции μ определяется условиями культивирования (селективные/неселективные) с естественным добавлением функции Моно как зависимости скорости роста микробной популяции от концентрации субстрата (Herbert et al., 1965; Monod, 1942), скорость передачи плазмид от варианта x к варианту $x+dx$ (или от $i \rightarrow i+1$) должна учитывать увеличение копийности плазмиды из-за репликации и снижение концентрации плазмиды из-за потери при делении клеток (Summers, 1996). Механизм “перепликации” плазмид зависит от биологии контроля репликации конкретной плазмиды и в общем случае описывается функцией $\lambda(x)$. Потеря плазмид при делении в среднем пропорциональна числу плазмид на клетку и обратно пропорциональна времени генерации клеток микроорганизмов (Paulsson et al, 1998). Определяя относительную копийность как $x = i/N$, где i - реальное число копий плазмиды на клетку и N - максимально возможное количество копий в клетке, скорость передачи плазмид от варианта x к варианту $x+dx$ (или от $i/N \rightarrow i/N + 1/N$) принимает вид:

$$\dot{x} = v = \lambda(x) - \tau\mu(x, S)x. \quad (7)$$

где τ - параметр, определяющий скорость уменьшения среднего числа копий на клетку в популяции микроорганизмов.

Подставляя уравнение (7) в систему (6) можно получить математическую модель, учитывающую сегрегационную и кинетическую нестабильность рекомбинантных штаммов микроорганизмов в случае культивирования в хемостате:

$$\begin{cases} \frac{\partial F(x,t)}{\partial t} = (\mu(x,S) - D)F(x,t) - \frac{\partial}{\partial x} F(x,t)[\lambda(x) - \tau x \cdot \mu(x,S)] \\ \frac{\partial F(0,t)}{\partial t} = (\mu(0,S) - D)F(0,t) + \tau \mu(0,S)F(0,t) + \int_0^1 \tau_0(x) \mu(x,S) F(x,t) dx \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \int_0^1 \frac{\mu(x,S) F(x,t)}{y(x,S)} dx \end{cases} \quad (8)$$

где $\tau_0(x)$ - вероятность образования бесплазмидной клетки при делении плазмидной с копийностью x и $\lambda'(0) = 0$. Выражение (8) является финальной математической моделью, описывающей популяционную динамику плазмидсодержащих микроорганизмов, содержащих сегрегационно ($\tau_0 \neq 0$) и кинетически ($\mu(x,S) \neq \text{const}$) нестабильные природные и рекомбинантные плазмиды.

В большинстве случаев анализ непрерывных моделей проводится гораздо проще и более того, более элегантно (см., например, сравнительный анализ непрерывных и дискретных моделей, May & Nowak, 1995), поэтому модель (8) предпочтительна хотя бы с этой стороны. Тем не менее, приближение “непрерывной копийности” может быть не совсем точным, особенно для плазмид с малой копийностью (low copy number plasmids), и соответственно, предсказания непрерывной модели могут быть не совсем корректными. В этом случае дискретная модель (1) должна быть использована для описания популяционной динамики бактериальных плазмид.

ОБЩИЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ СВОЙСТВ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ДИНАМИКИ МНОГОКОПИЙНЫХ МНОГОПЛАЗМИДНЫХ ПЛАЗМИД МИКРООРГАНИЗМОВ

Математическая модель (6) с легкостью может быть обобщена для моделирования динамики многоплазмидных (т.е. содержащих несколько *различных* плазмид)

рекомбинантных штаммов микроорганизмов и изучения связанных с этим новым обобщением свойств, например несовместимости разных плазмид в одной клетке. Для этого необходимо 2 основных шага (Ганусов и др., 1999; Ганусов и Брильков, 1999). Первое, это сформировать вектор потока плазмид в популяции:

$$\bar{R} = (x_1 \quad x_2 \quad \bullet \quad \bullet \quad x_j) \quad (9)$$

где x_l - относительная концентрация плазмид типа l . Под типом можно понимают либо разные, либо структурно измененные плазмиды. Второе, это описать взаимоотношения между классами плазмид, т.е. совместимость/несовместимость, сегрегационную и структурную нестабильность и др.:

$$\frac{dx_i}{dt} = f_i(x_1, x_2, \dots, x_j), \quad i = 1, 2, \dots, j \quad (10)$$

Используя уравнение (10) и основной подход (6) мы окончательно находим уравнение, описывающее динамику многоплазмидного штамма:

$$\frac{\partial F}{\partial t} + \sum_{i=1}^j f_i \cdot \frac{\partial F}{\partial x_i} = \left[\mu(\bar{R}, S) - D - \sum_{i=1}^j \frac{\partial f_i}{\partial x_i} \right] \cdot F \quad (11)$$

В завершенной форме уравнение (11) должно быть дополнено уравнением на лимитирующий рост субстрат. Решение системы (11) при различных условиях культивирования позволит исследовать особенности поддержания плазмид в популяции микроорганизмов с возможностью сосуществования (хотя возможно и не длительного) нескольких плазмид в бактериальных клетках.

Необходимо, однако, отметить, что и хотя сформулированный подход и основанная на нем математическая модель позволяют исследовать особенности динамики *разных* плазмид с учетом их несовместимости, к настоящему времени достаточно подробно изучена популяционная динамика плазмиднесущих микроорганизмов, содержащих плазмиды только одного типа (например, pBR322, R1, ColE1, pGLO, RP1-RP4, F), хотя и здесь многие вопросы остаются неотвеченными

(Bremer & Lin-Chao, 1986; Summers, 1996). Руководствуясь этими соображениями, дальнейший анализ математической модели (8) будет проведен в предположении, что исследуемый микроорганизм содержит плазмиду одного типа (например, pBR322).

НЕКОТОРЫЕ РЕШЕНИЯ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

В этой части мы рассмотрим динамику распределения клеток с различной копийностью в популяции рекомбинантного штамма при непрерывном культивировании. Для упрощения анализа мы используем приближение, что в начале культивирования средняя копийность на клетку является очень большой (это например возможно достичь хлорафеминиколом или манипуляцией скорости роста плазмиднесущих клеток (Summers, 1996)), а теоретическое значение средней копийности в новых условиях (после установления стационарного состояния по числу копий, которое определяется из уравнения (7) при $\dot{x} = 0$) является достаточно малым (см., например, (Lin-Chao & Bremer, 1986)). В этой аппроксимации, мы можем пренебречь двумя функциями $\tau_0(x)$ и $\lambda(x)$ в модели (8). Так как копийность в начале культивирования предполагается достаточно большой, мы также не будем учитывать динамику бесплазмидных клеток (второе уравнение в (8)). Как снятие этих ограничений повлияет на общность наших выводов мы обсудим при обсуждении полученных результатов.

Для получения модели в наиболее простой форме мы предлагаем провести следующую замену переменных:

$$\begin{aligned} v &= D/\mu_{\max}, \quad \sigma = S/K_S, \quad \sigma_0 = S_0/K_S, \quad t = t\mu_{\max}, \\ \mu &= \mu(x, \sigma) = \mu_x \mu_\sigma = \sigma/(1 + \sigma)\mu_x, \quad \Psi = F/(K_S y_0), \end{aligned} \quad (12)$$

после которой получаем модель (8) в безразмерном виде:

$$\begin{cases} \frac{\partial \Psi}{\partial t} = (\mu_\sigma \mu_x - v)\Psi + \tau \cdot \frac{\partial}{\partial x} (x \cdot \mu_\sigma \mu_x \cdot \Psi), \\ \frac{d\sigma}{dt} = v[\sigma_0 - \sigma] - \mu_\sigma \int_0^1 \rho(x) \frac{\mu_x \Psi}{y} dx. \end{cases} \quad (13)$$

Так как полная модель (13) в общем случае не интегрируема, мы получим несколько аналитических решений $\Psi(x, t)$ в приближении роста популяции в хемостате (турбидостате или периодике) в состоянии, близком к стационарному. При этом μ_σ не зависит от концентрации субстрата, $\mu \approx \nu$ и система (13) сводится к следующей:

$$\begin{cases} \frac{\partial \Psi}{\partial t} = \tau \cdot \frac{\partial}{\partial x} (x \cdot \mu_\sigma \mu_x \cdot \Psi) \\ \frac{d\sigma}{dt} = \nu(\sigma_0 - \sigma) - \mu_\sigma \int_0^1 \rho(x) \frac{\mu_x \Psi}{y} dx \end{cases} \quad (14)$$

Поскольку $\tau \ll 1$, переменную σ можно заменить её стационарным значением $\bar{\sigma}$, и тогда система (14) сводится к одному уравнению для Ψ :

$$\frac{\partial \Psi}{\partial t} = \tau \frac{\partial}{\partial x} (x \cdot \mu_x \Psi), \quad (15)$$

где, не исключая общности, мы положили $\mu_\sigma = 1$. Решение уравнения (15) мы проведем для двух типов зависимости $\mu_x(x)$ - нулевого и линейного приближений.

1. Нулевое приближение. Пусть $\mu_x = 1$, и начальное распределение плазмид по клеткам задано в виде волнового пакета с малой дисперсией a^2 :

$$\Psi(x, 0) = \theta(1-x) \exp\left(-\frac{(x-1)^2}{a^2}\right), \quad (16)$$

где $\theta(x)$ - функция Хевисайда:

$$\theta(x) = \begin{cases} 0, & x < 0 \\ 1, & x \geq 0 \end{cases}$$

При $\mu_x = 1$ нетрудно проверить, что частное решение уравнения (15), удовлетворяющее начальному распределению (16), имеет вид:

$$\Psi(x, t) = \theta(1 - xe^{\pi}) \cdot \exp\left\{\pi t - \frac{(xe^{\pi} - 1)^2}{a^2}\right\} \quad (17)$$

Выражение (17) описывает снижение концентрации плазмиднесущих клеток с течением времени¹ (рис. 2). Дисперсия распределения при такой динамике, как это видно из рис. 2, уменьшается. Скорость же элиминации плазмиднесущих клеток совпадает со скоростью снижения средней копиинности в популяции микроорганизмов, которое в общем случае дается отношением $\int_0^1 x\Psi(x, t)dx / \int_0^1 \Psi(x, t)dx$. Для ситуации, когда скорость роста плазмидсодержащих клеток не зависит от числа копий плазмиды на клетку (решение дано выражением (17)), снижение среднего числа копий является экспоненциальным $\exp(-\tau Dt)$ и не зависимым от начального числа копий плазмиды в клетках бактерий.

Рис 2 где-то здесь

Анализ экспериментальных данных *Jones et al.* (Jones et al., 1980) и *Brownlie et al* (Brownlie et al., 1990), изображенных на рис. 3 демонстрирует корректность этого результата. В своих экспериментах авторы прослеживали динамику плазмиднесущих бактерий при различных условиях культивирования. При тщательном анализе этих данных мы обнаружили, что хотя авторы и использовали различные условия культивирования и разные плазмиды, динамика среднего числа копий на клетку в популяции бактерий являлась близкой к экспоненциальной (регрессионный коэффициент $r > 0.9$), как это и предсказывается решением (17) (за исключением начальных точек, где мы полагаем возможный лаг период при инокуляции микробной культуры в свежую среду (Davis et al., 1990)).

Рис 3 где-то здесь

¹ Необходимо напомнить, что это приближение работает, пока копиинность не упала до предельно малых значений (например, 20% от исходной концентрации).

Обе плазмиды pBR322 и pAT153 являлись сегрегационно нестабильными при непрерывном культивировании в хемостате, более того, соответствующие скорости потери плазмид (что отражено в общей модели (8) и в частном решении (17) параметром τ) были оценены как $\tau \approx 0.03$ и $\tau \approx 0.09$ на генерацию соответственно для pBR322 и pAT153. Очевидно, что разные плазмиды (pBR322 и pAT153) снижают свою копияность с разной скоростью. Существенно, однако, что две оценки (0.03 и 0.09) являются гораздо меньшими, чем предсказывается простой моделью, разработанной Paulsson *et al.* (Paulsson *et al.*, 1998), где $\tau = 1$. Другим интересным наблюдением является то, что решение (17) описывает динамику снижения числа копий даже при малой копияности (~10-20%), где, строго говоря, решение (17) не может быть применено.

2. Линейное приближение. Известно, что экспрессия клонированных в плазмидах генов влияет на максимальную удельную скорость роста популяции, содержащей эти гены (Aiba *et al.*, 1982; Chiang & Bremer, 1988; Dunn *et al.*, 1995; Fleming & Patching, 1994; Lee & Edlin, 1985; Lin-Chao & Bremer, 1986; Nguyen *et al.*, 1989; Summers, 1996; Uhlin & Nordstrom, 1977; Walmsley *et al.*, 1983; Zund & Lebek, 1980). Хотя и точный механизм этого явления пока не выяснен до конца, и вероятно является уникальным для каждой плазмиды, в математической модели (8) эту феноменологическую зависимость можно выразить следующим образом:

$$\mu = \mu(x, S, \varepsilon) = \frac{\mu_{\max}(\varepsilon) \cdot S}{K_s + S}, \quad (18)$$

где ε - эффективность экспрессии плазмидных генов. При условии, что затраты на экспрессию плазмидных генов много меньше затрат на рост и поддержание жизнедеятельности бактерий (Chiang & Bremer, 1988; Engberg *et al.*, 1975; Smith & Bidochka, 1998; Zund & Lebek, 1980), и из предположения о независимой экспрессии различных копий в клетке бактерии следует:

$$\frac{\mu}{\mu_{\max}} \approx \frac{S}{K_s + S} \cdot \left[1 - \frac{\varepsilon_{\max}}{\mu_{\max}} x \right] = \mu_{\sigma} \cdot [1 - \beta x]. \quad (19)$$

где параметр β характеризует влияние эффективности экспрессии клонированных в плазидах генов на удельную скорость роста популяции рекомбинантного штамма и ε_{\max} - эффективность экспрессии плазмидных генов при максимальной копииности в клетках популяции $x = 1$.

Заметим, что при выборе скорости роста популяции в виде $\mu(x) = 1 - \beta x$ мы неявно предполагаем, что динамическая замена клеток с высокой копииностью ($x \approx 1$) на штамм с малой копииностью ($x < 1$) качественно не меняет стационарное состояние в непрерывной культуре. Хотя это приближение может быть верным при очень малых β , более корректно использовать $\mu(x) = (1 - \beta x)/(1 - \beta)$. При таком выборе скорости роста, селективное преимущество бесплазмидных клеток α выражается таким же образом, как и в предыдущем случае, т.е. $\alpha(x) = \beta x$. Решение уравнения (15) тогда находится в виде:

$$\Psi(x, t) = \Psi_0 \left[\frac{x \exp\left(\frac{\pi}{1 - \beta}\right)}{1 + \beta x \left(\exp\left(\frac{\pi}{1 - \beta}\right) - 1\right)} \right] \exp\left\{ \frac{\tau + \beta}{1 - \beta} t - \left(\frac{1}{\tau} + 2\right) \text{Ln} \left[1 + \beta x \left(\exp\left(\frac{\pi}{1 - \beta}\right) - 1\right) \right] \right\} \quad (20)$$

Заметим, что в пределе $\beta \rightarrow 0$ решение (20) совпадает с (17). Динамика распределения (20) изображена на рис. 2, из которого видно, что даже настолько упрощенная модель предсказывает большую скорость элиминации плазмид при их высокой “стоимости” (большие β), что, впрочем, достаточно тривиально. Отметим также, что плотность популяции рекомбинантного штамма также меньше для плазмид с высокой β , что очевидно связано с энергетическими затратами клетки на репликацию и поддержание плазмид.

Рис. 4 где-то здесь

Решение (20) также подразумевает, что в появление малокопийных вариантов в изначально гомогенной (высококопийной) плазмидсодержащей микробной популяции вовлечены два основных процесса. Во-первых, плазмиды теряются при их неравной сегрегации (или, если это более удобно, через “разбавление” плазмид), что описывается

параметром τ и дано решением (17). При малых β мы ожидаем, что скорость снижения средней копияности будет порядка τ , (рис. 4, регрессия кривой 1), тогда как увеличение β должно вести к непропорциональному увеличению скорости снижения средней копияности плазмиды в популяции микроорганизмов (на рис. 4 - в два раза, регрессия кривой 2). Таким образом, модель предсказывает, что повышение энергетической стоимости плазмиды, характеризуемой параметром β (или $\alpha = \beta x$ при $x = \text{const}$), ведет к снижению общей стабильности плазмиднесущих клеток микроорганизмов при непрерывном культивировании.

ВРЕМЯ ПОЛУЭЛИМИНАЦИИ ПЛАЗМИД В ХЕМОСТАТЕ.

Используя математическую модель (8), мы можем определить характерное время, в течение которого полное число плазмид в популяции плазмидсодержащего штамма снизится вдвое (или так называемое, время полуэлиминации плазмид (Ганусов и др, 1999; Ганусов и Брильков, 1999)). Это время находится из следующей теоремы.

Теорема. Время полуэлиминации бактериальных плазмид в хемостате не зависит от максимального числа копий плазмиды в клетке, а удовлетворяет следующему неравенству:

$$\frac{g}{\tau + \alpha_{\max}} \leq T_{1/2} \leq \frac{g}{\tau}, \quad (21)$$

где $g = \ln(2)/D$ - время генерации в хемостате со скоростью протока D и α_{\max} - максимальное значение селективного коэффициента $\alpha(x) = 1 - \mu(x, S)/\mu(0, S)$.

Доказательство. Полное количество плазмид в популяции определяется как:

$$L(t) = \int_0^1 x \Psi(x, t) dx \quad (22)$$

и удовлетворяет следующему уравнению:

$$\frac{dL}{dt} = -\nu \cdot L + (1 - \tau) \cdot \int_0^1 x \mu(x, \sigma) \Psi dx \quad (23)$$

1. $T_{1/2} \leq \frac{g}{\tau}$. Для доказательства этого неравенства мы предположим, что скорость роста плазмидсодержащих клеток не зависит от копийности этих клеток, т.е. $\alpha = 0$. Стационарное состояние в хемостате в этом приближении будет достигнуто с экспоненциальной скоростью $e^{-\nu t}$ за несколько генераций. По определению в стационарном состоянии в хемостате должны выполняться следующие условия (Herbert et al., 1965; Moser, 1958):

$$\begin{aligned} \mu(x, \bar{\sigma}) &\approx \nu, \\ d\bar{\sigma} / dt &= 0. \end{aligned} \quad (24)$$

из чего следует верхняя оценка $T_{1/2} = \frac{g}{\tau}$.

2. $T_{1/2} \geq \frac{g}{\tau + \alpha_{\max}}$. При $\alpha \neq 0$ мы находим следующее уравнение для динамики полного числа копий:

$$\frac{dL}{dt} = -\nu L + (1 - \tau) \mu(0, \sigma) \int_0^1 x \Psi(x, t) (1 - \alpha(x)) dx \quad (25)$$

В процессе элиминации плазмидсодержащего штамма микроорганизмов верно неравенство $\mu(0, \sigma) \geq \nu$, следовательно, производная $\dot{L}(t)$ является ограниченной:

$$\frac{dL}{dt} \leq -\tau \nu L - \nu \int_0^1 \alpha(x) x \Psi(x, t) dx \leq \tau \nu L - \nu \alpha_{\max} L \quad (26)$$

что и доказывает вторую часть неравенства (21).

Рис. 5 где-то здесь

Из неравенства (21) следует, что время полуэлиминации плазмид из микробной популяции в стационарном состоянии в хеостате определяется тремя основными параметрами плазмидсодержащего штамма: временем генерации (которое в общем случае задается скоростью протока), скоростью потери плазмид при делении, характеризуемой параметром τ , и селективным преимуществом бесплазмидных клеток (точнее, его максимальным значением). Тот факт, что при $\alpha = 0$ время полуэлиминации не зависит от *максимального числа* копий плазмиды в клетке, продемонстрирован на рис. 5.

Таким образом, если известны параметр τ , среднее время генерации клеток микроорганизмов g и максимальное значение селективного коэффициента α_{\max} , то с помощью выражения (21) можно оценить характерную длительность процессов ферментации штаммов сверх-продуцентов до того момента времени, когда продуктивность рекомбинантного штамма снизится из-за потери плазмид с клонированными в них генами примерно вдвое. С этой точки зрения, время полуэлиминации (21) может служить важной характеристикой популяционной устойчивости генноинженерных штаммов-продуцентов.

СТАЦИОНАРНЫЕ РЕШЕНИЯ.

Стационарные распределения можно получить из математической модели (13) при $t \rightarrow \infty$, когда производные по времени равны нулю, или:

$$\begin{cases} [\mu_{\sigma} \mu_x - \nu] \bar{\Psi} + \tau \cdot \frac{\partial}{\partial x} (x \cdot \mu_{\sigma} \mu_x \cdot \bar{\Psi}) = 0, \\ \nu(\sigma_0 - \bar{\sigma}) - \mu_{\sigma} \int_0^{\infty} \frac{\mu_x \bar{\Psi}}{y} dx = 0. \end{cases} \quad (27)$$

Неселективные условия. В неселективных для поддержания плазмид условиях удельная скорость роста микробной популяции удовлетворяет условию $\partial \mu / \partial x \leq 0$. При $\mu_x = 1$ стационарное распределение бактериальных клеток с различным числом копий плазмиды имеет вид:

$$\Psi(x) \approx C \exp\left(\frac{\ln x}{\tau} \left(\frac{\mu_\sigma}{\nu} - 1\right)\right), \quad (28)$$

где C - нормировочная константа, которая находится из условия стационарности для второго уравнения системы (27):

$$\int_0^\infty \bar{\Psi}(x) dx = \bar{\Psi}_\Sigma [\bar{\sigma}] = \sigma_0 - \bar{\sigma}, \quad (29)$$

где $\bar{\Psi}_\Sigma$ - стационарное значение полной биомассы клеток. Нетрудно проверить, что в неселективных для поддержания плазмид условиях нормированное стационарное распределение клеток с различной копийностью определяется:

$$\bar{\Psi}(x, t) = \lim_{A \rightarrow 0} \left[-\frac{\bar{\Psi}_\Sigma}{2x \cdot \ln(A)} \right] = \bar{\Psi}_\Sigma \delta(x), \quad (30)$$

где $\delta(x)$ - дельта- функция Дирака. Из выражения (30) следует, что непрерывного стационарного распределения в неселективных условиях не существует, т.е. в этом случае при $t \rightarrow \infty$ в хемостате существуют только бесплазмидные клетки.

Селективные условия. В селективных для поддержания плазмид условиях, например, при ингибировании роста бактерий антибиотиками, устойчивость к которым у бактерий детерминируется плазмидными генами, можно предположить, что удельная скорость роста популяции прямо пропорциональна количеству копий плазмиды в клетках этой популяции. В этом случае можно положить, что $\mu_x = Kx$, где K - коэффициент пропорциональности, связанный определенным образом с константой ингибирования. Конечное стационарное распределение клеток в популяции бактерий по копиям плазмиды при культивировании в хемостате выражается тогда следующим образом:

$$\bar{\Psi}(x) = \frac{\bar{\Psi}_{\Sigma}}{\Gamma\left(1 + \frac{1}{\tau}\right) \cdot \left(\frac{\tau\mu_{\sigma}K}{\nu}\right)^{1 + \frac{1}{\tau}}} \cdot \frac{\exp\left[-\frac{\nu}{\tau\mu_{\sigma}Kx}\right]}{x^{2 + \frac{1}{\tau}}}, \quad (31)$$

где $\Gamma(1 + 1/\tau)$ - гамма-функция Эйлера.

Рис. 6 где-то здесь

Стационарное распределение (31) представляет собой несимметричную кривую, и для разных значений параметра K изображено на рис. 6 (ср. с Bailey et al., 1983; Lobner-Olesen, 1999; Srienc et al., 1986; Tseng et al., 1997). Очевидно, что существует критическое значение копийности, не обеспечивающее выживания малокопийных клеток в селективных условиях (рис. 6). Выражение (31) включает в себя и возможность многократного увеличения среднего числа копий плазмиды в клетке в селективных условиях (амплификации) при соответствующих значениях постоянной K , величина которой характеризует уровень селективного давления.

СНИЖЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОГО ПРЕИМУЩЕСТВА БЕСПЛАЗМИДНЫХ КЛЕТОК.

Молекулярным генетикам хорошо известен экспериментальный факт снижения селективного преимущества бесплазмидных вариантов рекомбинантного штамма при длительном культивировании в неселективных условиях в хемостате (Brownlie et al., 1990; Jones et al., 1980; Печуркин и др., 1990; Брильков и др., 1990). Рассмотрим этот эффект поподробнее на данных (Jones et al., 1980). В этой работе авторы обнаружили высокую скорость элиминации плазмидсодержащих клеток из хемостата, если начальная культура содержала малое (0.01%) число бесплазмидных клеток (см. рис. 7, кривая 1).

Рис. 7 где-то здесь

Скорость элиминации плазмидсодержащего штамма была снижена, если начальный инокулят не содержал бесплазмидных вариантов (рис. 7, кривая 2а). В противоположность такому поведению, стандартная математическая модель, разработанная Левиным и Стюартом (Stewart & Levin, 1977) для описания динамики плазмидсодержащих микроорганизмов, предсказывает неизменную скорость снижения числа плазмиднесущих клеток (рис. 7, кривая 2б). Очевидно, что это связано с фактом, что модель Левина-Стюарта описывает динамику только двух типов клеток: бесплазмидных и клеток с максимальным числом копий плазмиды, что автоматически предполагает идеальный контроль копийности плазмид, который мгновенно и необычайно точно корректирует отклонения числа копий в клетке от некоторого заданного среднего. В реальности, однако, контроль копийности не является идеальным даже в случае экспоненциального механизма ингибирования, а, следовательно, *биологически корректная* модель должна учитывать *распределение* копий плазмиды в клетках микроорганизмов (Paulsson & Ehrenberg, 1998; Summers, 1996; Брода, 1982). Главное отличие распределенной модели (1) и (8), учитывающей “разнокопийность” плазмидных штаммов, от модели Левина-Стюарта состоит в том, что параметры рекомбинантного штамма в распределенной модели, как, например, скорость роста популяции и вероятность образования бесплазмидной клетки при делении, теперь зависят от числа копий плазмиды на клетку, и, следовательно, не являются постоянными параметрами как в сосредоточенной (Левина-Стюарта) модели (исключая случай, когда копийность является постоянной величиной, что практически недостижимо (Paulsson & Ehrenberg, 1998)).

В реальности, однако, копийность определенной клетки (впрочем, как и среднее число копий плазмиды в популяции микроорганизмов) постоянно подвержена спонтанным изменениям, обусловленным неточностью контроля копийности репликации плазмид, случайностью сегрегации плазмид при делении и рядом других факторов, которые очевидно зависят от условий культивирования. Например, перенос растущих бактерий из одной среды (LB) в другую (минимальная DM или M9), часто связан с рядом метаболических перестроек, ведущих в частности к изменению средних размеров клеток и средней копийности в популяции плазмидсодержащих штаммов (Печуркин, 1978; Печуркин и др., 1990; Дебабов и Лифшиц, 1988; Brendel & Perelson, 1993; Churchward et al., 1982; Davis et al., 1990; Lee & Bailey, 2000; Lin-Chao & Bremer, 1986).

Если мы предположим, что среднее число копий плазмиды pBR322 на клетку в популяции бактерий при культивировании в хемостате ($D = 0.1 \text{ час}^{-1}$) является небольшим, а в инокулятной культуре ($D = 1.5 - 2 \text{ час}^{-1}$) повышенным, то это может объяснить снижение средней копийности плазмиды pBR322 в популяции рекомбинантного штамма при длительном культивировании в хемостате, как (Jones et al., 1980) и наблюдали (см. рис. 7). Такое снижение может быть связано как со снижением среднего размера бактериальных клеток при низких скоростях роста (Akerlund et al., 1995; Churchward et al., 1982), так и с усилением транскрипции ингибиторной молекулы RNAI при увеличении времени генерации (Atlung et al., 1999; Lin-Chao & Bremer, 1986; Lin-Chao & Bremer, 1987). Учитывая этот факт и предполагая нелинейную связь между удельной скоростью роста популяции плазмиднесущих бактерий и копийностью в клетках $\mu(x) \sim 1 - \beta x^m$, с помощью математической модели (1) мы попытались описать динамику снижения средней копийности и уменьшения фракции плазмидсодержащих клеток в популяции бактериального штамма при длительном культивировании в хемостате на основе данных (Jones et al., 1980).

Как, впрочем, мы и ожидали (см. рис. 7), математическая модель (1) достаточно точно описывает изменение среднего числа копий плазмиды pBR322 в популяции плазмидсодержащих бактерий, как и было получено ранее с использованием решения (20) приближенной непрерывной модели (8) (см. рис. 3)².

Более того, динамическая замена исходно гомогенного плазмиднесущего штамма (или смешанной популяции “плазмидных-бесплазмидных” клеток) на бесплазмидный вариант также происходит достаточно близко к динамике, предсказываемой численным решением модели (1, 8). Отметим, что мы так и не смогли достичь того же результата с помощью модели Левина-Стюарта (рис. 7, кривая 2б) по причинам, объясненным выше. Мы также нашли интригующим, что наиболее правдоподобная регрессия модели (1) к данным (Jones et al., 1980) осуществляется при $m > 1$, что в принципе означает нелинейную зависимость “стоимости” плазмиды (селективного коэффициента рекомбинантного штамма) от копийности бактериальных клеток. Этот результат также следует из следующей цепочки простых рассуждений. Селективный коэффициент пропорционален тангенсу угла наклона кривой z в логарифмических координатах при

² Отличие параметра τ ($\tau=0.03$ на рис. 2 вместо $\tau=0.025$ на рис. 7), связано с фактом, что регрессия (17) была использована в приближении $\beta=0$ (см. рис. 2).

$z \gg 1$, где $z = p - / p +$ - отношение концентрации бесплазмидных клеток к концентрации плазмидсодержащих клеток (Брильков и др., 1990, в приготовлении). Оценка селективного коэффициента в начале и конце культивирования дает соответственно значения $\alpha_1 \approx 0.68$ и $\alpha_2 \approx 0.09$ (с изменением $\alpha_1/\alpha_2 \approx 8$). Сравнение изменения относительной средней копииности (x_1/x_2) дает отношение приблизительно равное 5 (см. рис.7б). Таким образом, снижение копииности в 5 раз приводит к снижению селективного преимущества в 8 раз, следовательно, т.к. $x_2/x_1 \neq \alpha_2/\alpha_1$, зависимость селективного коэффициента от копииности должна быть нелинейной, что и соответствует полученному с помощью математической модели выводу ($m \approx 1.4$). Суммируя, мы заключаем, что математическая модель (1) действительно подтверждает, что факт снижения селективного преимущества бесплазмидных клеток при длительном культивировании рекомбинантных штаммов в хемостате есть прямое следствие уменьшения среднего количества копий плазмиды (на клетку) в популяции микроорганизмов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ.

Подход к моделированию динамики численности биологических популяций, основанный на распределенных моделях и уравнении непрерывности, нельзя признать новым, так как он использовался ранее рядом исследователей для описания распределения организмов по некоторым признакам, например, возрасту или размерам (Свиричев, 1978; Полуэктов, 1974; Степанова, 1980; Свиричев и Пасеков, 1974). Однако подход, предложенный в настоящей работе и основанная на нем математическая модель, позволяют описывать популяционную динамику нестабильных плазмид многокопийных многоплазмидных штаммов микроорганизмов, в том числе с учетом несовместимости различных плазмид в одной клетке, что ранее не было рассмотрено (см., например, работы в этом направлении: Апонин и др, 1984; Апонина и др, 1984; Апонин и Апонина, 1996; Mongold, 1992).

В результате анализа упрощенной модели роста плазмидсодержащих бактерий в приближении стационарного роста нами были получены некоторые оригинальные результаты. Во-первых, найдено, что снижение среднего числа копий плазмиды в популяции микроорганизмов при смене условий культивирования

(периодика→хемостат) является экспоненциальным, причем скорость этого уменьшения отличается от предсказываемого простой моделью (Paulsson et al, 1998). Во-вторых, модель предсказывает, что “стоимость“ плазмиды ($\beta > 0$) ведет к более быстрой элиминации плазмиднесущих клеток, сохраняя при этом близость к экспоненциальному закону. В-третьих, разработанная модель позволила ввести новую характеристику нестабильных рекомбинантных штаммов – время полуэлиминации плазмид из хемостата, определяемое временем генерации в хемостате, скоростью потери плазмид при делении и максимальным значением селективного преимущества бесплазмидных клеток. И последнее, впервые теоретически объяснен эффект снижения селективного давления на популяцию многокопийного генноинженерного штамма, связанный со снижением среднего числа копий плазмиды в клетках. Более того, на примере данных (Jones et al., 1980) продемонстрировано, что удельная скорость роста популяции плазмидсодержащих микроорганизмов нелинейно зависит от числа копий плазмиды в клетках.

Тем не менее, частные решения непрерывной модели (8) были получены с использованием двух серьезных ограничений. Во-первых, мы предположили, что в начале культивирования (или, что то же самое, в инокулятной культуре) все клетки содержат достаточно большое число копий плазмиды. Если это приближение не выполняется (что возможно в определенных ситуациях), непрерывная модель перестает работать, так как в этом случае изменение относительной копийности на одну копию $1/N$ не является малым (что было использовано при выводе непрерывной модели), и, следовательно, не непрерывная, а дискретная модель (1) должна быть использована для описания динамики распределения клеток с разной копийностью и изменение среднего числа копий на клетку. Более того, низкая начальная средняя копийность в популяции плазмидсодержащих микроорганизмов может привести к образованию существенной фракции бесплазмидных клеток, которые могут кардинально изменить последующую динамику плазмиднесущего штамма (см, например, Jones et al., 1980), и динамика которых не учитывается явным образом в приближении (13). Во-вторых, для понимания эссенции динамики распределения клеток с различным числом копии плазмиды мы также пренебрегли контролем копийности плазмиды, описываемый функцией $\lambda(x)$. Это приближение может быть обосновано, если мы предположим, что стационарное значение средней копийности плазмидсодержащего штамма при длительном культивировании является достаточно низкой. Приближенное уравнение

на стационарное значение средней копийности в этом случае выражается как $\lambda(x) = \tau\mu x$, и следовательно, если $x \ll 1$, то $\lambda(x) \ll 1 \approx 0$, что и было использовано в модели (13).

Простейший анализ показывает, что могло бы произойти с динамикой среднего числа копий и распределения клеток с разной копийностью, если бы два вышеупомянутых условия не были бы удовлетворены в конкретной ситуации. Если $\tau_0(x) \neq 0$, динамика не меняется существенно при малых β , хотя при $\beta \approx 1$ динамика может отличаться от предсказываемой решениями (17) и (20) и изображенной на рис. 2 и 4. С другой стороны, учет контроля копийности ($\lambda(x) \neq 0$) приведет к снижению скорости уменьшения среднего числа копий на клетку из-за репликации плазмид, и, следовательно, при $x \approx 0$ мы ожидаем отклонение снижения средней копийности от экспоненциального закона.

Снятие ограничений $\lambda(x) \approx 0$ и $\tau_0(x) \approx 0$ также повлияет на форму стационарных распределений в математической модели (8). В неселективных условиях, однако, плазмиды действительно не могут поддерживаться бесконечно долго, и в конце-концов начальный плазмидсодержащий штамм заменяется бесплазмидным вариантом, но по причине ненулевой вероятности образования бесплазмидной клетки τ_0 . В селективных же условиях образование бесплазмидных клеток не является важным из-за отсутствия роста таких клеток в присутствии, например, антибиотика (мы исключаем возможность разрушения внеклеточного антибиотика плазмидсодержащими клетками, а, следовательно, возможность роста бесплазмидных вариантов). С другой стороны, наличие негативного контроля копийности $\lambda(x) \neq 0$ приведет к селекции клеток с копийностью \tilde{x} , определяемой в уравнении $\lambda(\tilde{x}) = \tau\mu(\tilde{x}, S)\tilde{x}$ (не показано), соответственно, стационарное распределение будет представлять собой симметричное распределение с $x_{cp} = \tilde{x}$ в отличие (31) (не показано). Стационарное распределение (31) может наблюдаться для плазмид с нарушенным механизмом контроля копийности (Chiang & Bremer, 1991), когда определенная копийность плазмиды селектируется скорее уровнем антибиотика, а не негативным контролем репликации плазмид.

При всех использованных ограничениях математическая модель (1, 6, 8) представляет совершенно новый и оригинальный подход к моделированию популяционной динамики плазмид микроорганизмов, которая позволила не только

объяснить наблюдаемые эффекты (как, например, снижение селективного преимущества бесплазмидных клеток при длительном культивировании в хемостате), но и предсказать ряд новых (как, например, время полуэлиминации плазмид из хемостата).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Апонин Ю.М., Апонина Е.А., Вельков В.В. Математическое моделирование процессов непрерывного культивирования микроорганизмов, содержащих нестабильные гибридные плазмиды. - Препр./ОНТИ НЦБИ АН СССР. - Пущино, 1984. - 21 с.
- Апонина Е.А., Апонин Ю.М., Вельков В.В. Кинетические коэффициенты плазмид и методология конструирования рекомбинантных ДНК - Препр./ ОНТИ НЦБИ АН СССР. - Пущино, 1984. - 11 с.
- Апонин Ю.М., Апонина Е.А. О некоторых условиях устойчивого поддержания нестабильных плазмид в микробных популяциях при длительном непрерывном культивировании/ В кн.: Исследования по математической биологии. Сб. научных трудов, посв. памяти А.Д. Базыкина. - Пущино: Изд- во Пущинского научного центра РАН, 1996. - С. 32 - 48
- Бейли Ж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. - М.:Мир, 1989, т.1 -692 с.
- Боронин А.М., Денисов Г.А., Лазарев П.И. Математические модели динамики численностей бактериальных плазмид. - Препр./ОНТИ НЦБИ АН СССР. - Пущино, 1983. - 43 с.
- Брильков А.В., Вологодская Л.В., Луцкая Н.И., Печуркин Н.С. Популяционная устойчивость плазмид. - Препр./ИБФ СО АН СССР. - Красноярск, 1990. - 56 с.
- Вельков В.В. Нестабильность рекомбинантных молекул// Генетика. -1983. - Т.19, N 10. - С.1575-1581.
- Ганусов В.В., Брильков А.В. Новый подход к моделированию динамики плазмид в популяциях микроорганизмов/ В сб.: Реконструкция гомеостаза. Красноярск. 1999. - С. 62-68
- Ганусов В.В., Брильков А.В., Печуркин Н.С. Структурный подход к моделированию популяционной динамики нестабильных рекомбинантных штаммов бактерий, содержащих многокопийные плазмиды// ДАН, 1999, № 397, С. 267-270

- Динамическая теория биологических популяций/ под ред. Р.А. Полуэктова. - М.: Наука, 1974. - 455 с.
- Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теория поля. - М.: Наука, 1973. - 504 с.
- Климонтович Ю.Л. Статистическая физика. - М.: Наука, 1982.
- Печуркин Н.С., Брильков А.В., Марченкова Т.В. Популяционные аспекты биотехнологии. - Новосибирск: Наука, 1990.- С.1-172.
- Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. Математическое моделирование в биофизике. - М.: Наука, 1975. - 344 с.
- Свирижев Ю.М. Математические модели биологических сообществ. В сб. Математическая биология и медицина. Т.1. - М.: Наука, 1978. - С. 117- 165.
- Свирижев Ю.М., Пасеков В.П. Основы математической генетики. - М.: Наука, 1974. - 455 с.
- Степанова Н.В. Математические модели непрерывной культуры микроорганизмов, распределенных по возрастам и размерам/ В сб.: Математические модели в экологии. - Горький: ГГУ, 1980. - С.95 - 113.
- Aiba, S., Tsunekawa, H. & Imanaka, T. (1982). New approach to tryptophan production by *Escherichia coli*: genetic manipulation of composite plasmids in vitro. *Appl Environ Microbiol* **43**(2), 289-97.
- Akerlund, T., Nordstrom, K. & Bernander, R. (1995). Analysis of cell size and ДНК content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**(23), 6791-7.
- Atlung, T., Christensen, B. B. & Hansen, F. G. (1999). Role of the rom protein in copy number control of plasmid pBR322 at different growth rates in *Escherichia coli* K-12. *Plasmid* **41**(2), 110-9.
- Bremer, H. & Lin-Chao, S. (1986). Analysis of the physiological control of replication of ColE1-type plasmids. *Journal of Theoretical Biology* **123**(4), 453-70.
- Brenner, M. & Tomizawa, J. (1991). Quantitation of ColE1-encoded replication elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(2), 405-9.
- Brownlie, L., Stephenson, J. R. & Cole, J. A. (1990). Effect of growth rate on plasmid maintenance by *Escherichia coli* HB101(pAT153). *J Gen Microbiol* **136**(Pt 12), 2471-80.
- Chiang, C. S. & Bremer, H. (1988). Stability of pBR322-derived plasmids. *Plasmid* **20**(3), 207-20.

- Chiang, C. S. & Bremer, H. (1991). Maintenance of pBR322-derived plasmids without functional RNAI. *Plasmid* **26**(3), 186-200.
- Churchward, G., Bremer, H. & Young, R. (1982). Macromolecular composition of bacteria. *J Theor Biol* **94**(3), 651-70.
- Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N. & Ginsburg, H. S. (1990). Microbiology. 4th edit, J.B.Lippincott Company, New York.
- Eliasson, A., Bernander, R., Dasgupta, S. & Nordstrom, K. (1992). Direct visualization of plasmid Δ HK in bacterial cells. *Mol Microbiol* **6**(2), 165-70.
- Godwin, D. & Slater, J. H. (1979). The influence of the growth environment on the stability of a drug resistance plasmid in Escherichia coli K12. *J Gen Microbiol* **111**(1), 201-10.
- Herbert, D., Phipps, P. J. & Tempest, D. W. (1965). The chemostat: design and instrumentation. *Lab Pract* **14**(10), 1150-61.
- Jones, I. M., Primrose, S. B., Robinson, A. & Ellwood, D. C. (1980). Maintenance of some ColE1-type plasmids in chemostat culture. *Mol Gen Genet* **180**(3), 579-84.
- Lin-Chao, S. & Bremer, H. (1986). Effect of the bacterial growth rate on replication control of plasmid pBR322 in Escherichia coli. *Molecular & General Genetics* **203**(1), 143-9.
- Lin-Chao, S. & Bremer, H. (1987). Activities of the RNAI and RNAII promoters of plasmid pBR322. *Journal of Bacteriology* **169**(3), 1217-22.
- Lin-Chao, S. & Cohen, S. N. (1991). The rate of processing and degradation of antisense RNAI regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo. *Cell* **65**(7), 1233-42.
- Lobner-Olesen, A. (1999). Distribution of minichromosomes in individual Escherichia coli cells: implications for replication control. *EMBO Journal* **18**(6), 1712-21.
- May, R. M. & Nowak, M. A. (1994). Superinfection, metapopulation dynamics and the evolution of diversity. *Journal of Theoretical Biology* **170**, 95-114.
- May, R. M. & Nowak, M. A. (1995). Coinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society, London, Series B* **261**, 209-215.
- Mongold, J. A. (1992). Theoretical implications for the evolution of postsegregational killing by bacteria plasmids. *Am Nat* **139**, 677-689.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology* **3**, 371-394.
- Nordstrom, K., Molin, S. & Light, J. (1984). Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology, and physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid* **12**(2), 71-90.

- Novick, A. & Szilard, L. (1950). Description of the chemostat. *Science* 112, 715-718.
- Paulsson, J. & Ehrenberg, M. (1998). Trade-off between segregational stability and metabolic burden: a mathematical model of plasmid ColE1 replication control. *J Mol Biol* 279(1), 73-88.
- Paulsson, J., Nordstrom, K. & Ehrenberg, M. (1998). Requirements for rapid plasmid ColE1 copy number adjustments: a mathematical model of inhibition modes and RNA turnover rates. *Plasmid* 39(3), 215-34.
- Pirt, S. J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific publications, Oxford.
- Proctor, G. N. (1994). Mathematics of microbial plasmid instability and subsequent differential growth of plasmid-free and plasmid-containing cells, relevant to the analysis of experimental colony number data. *Plasmid* 32(2), 101-30.
- Smith, M. A. & Bidochka, M. J. (1998). Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Canadian Journal of Microbiology* 44(4), 351-5.
- Srienc, F., Campbell, J. L. & Bailey, J. E. (1986). Flow cytometry analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* populations. *Cytometry* 7(2), 132-41.
- Stewart, F. M. & Levin, B. R. (1977). The population biology of bacterial plasmids: a priori conditions for the existence of conjugationally transmitted factors. *Genetics* 87, 209-228.
- Summers, D. K. (1996). *The biology of plasmids*, Blackwell science,, Cambridge, MA.
- Tseng, W. C., Haselton, F. R. & Giorgio, T. D. (1997). Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J Biol Chem* 272(41), 25641-7.
- Zund, P. & Lebek, G. (1980). Generation time-prolonging R plasmids: correlation between increases in the generation time of *Escherichia coli* caused by R plasmids and their molecular size. *Plasmid* 3(1), 65-9.

Подписи к рисункам к статье Ганусова В.В. с соавторами “Распределенная модель популяционной динамики бактериальных плазмид”// Математическое моделирование, 1999.

Рис. 1. Простейшая репрезентация процессов, вовлеченных в популяционную динамику клеток с различной копийностью. λ_i - скорость репликации плазмид (из-за негативного контроля копийности), τ_i - параметр, характеризующий скорость “разбавления” плазмид при деление (с учетом *случайного* распределения плазмид между дочерними клетками), $\tau_0(i)$ - вероятность образования бесплазмидной клетки при делении клетки с i копиями плазмиды, μ_i - удельная скорость роста популяции с копийностью i .

Рис. 2. Динамика распределения клеток по количеству копий плазмиды в хемостате в приближении стационарного роста. Непрерывная линия - $\mu_x = 1$, штрихованная - $\mu_x = 1 - \beta x$. Параметры модели: $\nu = \mu_\sigma = 1$, $\tau = 0.01$, $a = 0.1$, $\beta = 0.1$. Распределения: 1- начальное, 2- при $50 t$, 3- при $100 t$.

Рис. 3. Динамика среднего числа копий плазмиды pBR322 (ромб, Jones et al., 1980) и pAT153 (треугольник, Brownlie et al., 1990) при непрерывном культивировании в хемостате при скорости протока соответственно $D=0.25 \text{ час}^{-1}$ и $D=0.15 \text{ час}^{-1}$. Непрерывные линии получены в соответствии с предсказанием решения (17). Скорость потери плазмид была оценена как $\tau \approx 0.03$ и $\tau \approx 0.09$ на генерацию соответственно для pBR322 и pAT153.

Рис. 4. Изменение средней копийности в популяции плазмидсодержащих клеток при культивании в хемостате по модели при $\tau = 10^{-2}$, 1- $\beta = 0.1$, 2- $\beta = 0.5$. Точки рассчитаны в соответствии с выражением (20), непрерывные линии описывают экспоненциальную регрессию.

Рис. 5. Снижение полного числа копий плазмиды в популяции в хемостате в неселективных условиях при разном максимальном числе копий в клетке N ($\tau = 10^{-2}$). 1

- $N = 50$, 2 - $N = 30$, 3 - $N = 10$. Стрелкой отмечено время полуэлиминации плазмид. По оси ординат - общее количество плазмид в популяции бактерий в условных единицах.

Рис. 6. Стационарное распределение клеток по копиям плазмиды в хемостате в селективных для поддержания плазмид условиях (расчет по формуле (31)). 1 - $C = 2 \cdot 10^5$, $\mu_\sigma \approx \nu$, $\tau = 10^{-1}$, $K = 1$; 2 - $C = 0.105$, $\mu_\sigma \approx \nu$, $\tau = 10^{-1}$, $K = 3$

Рис. 7. Снижение селективного преимущества бесплазмидных вариантов плазмидсодержащего (pBR322) рекомбинантного штамма при длительном культивировании в неселективных условиях в хемостате (расчеты по модели (1)). А. 1 - результат конкуренции бесплазмидного варианта и исходного рекомбинантного штамма при числе копий плазмиды в клетках $n=35$ в начале культивирования. В начальный момент времени добавлено 0.01% бесплазмидных изогенных клеток; 2а - замещение исходного штамма бесплазмидным вариантом при длительном культивировании по модели (1), 2б - то же по модели Левина-Стюарта. Б. Изменение среднего числа копий плазмиды в популяции плазмидсодержащего штамма. Во всех расчетах полагалось: $\mu = (1 - \beta(i/n)^m) \cdot S / (1 + S)$, $m = 1.4$, $\tau = 2.5 \cdot 10^{-2}$, $D = 0.25 \text{ час}^{-1}$, $\lambda = \tau \rho k_{II} i \exp(-i/K)$, $K = 0.56$, $\rho k_{II} = 2.5 \text{ час}^{-1}$, $\beta = 0.67$. Точки - экспериментальные данные из (Jones et al., 1980).

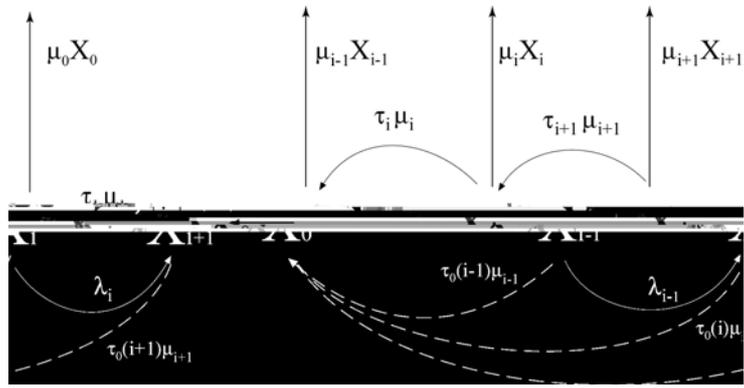


Рис. 1.

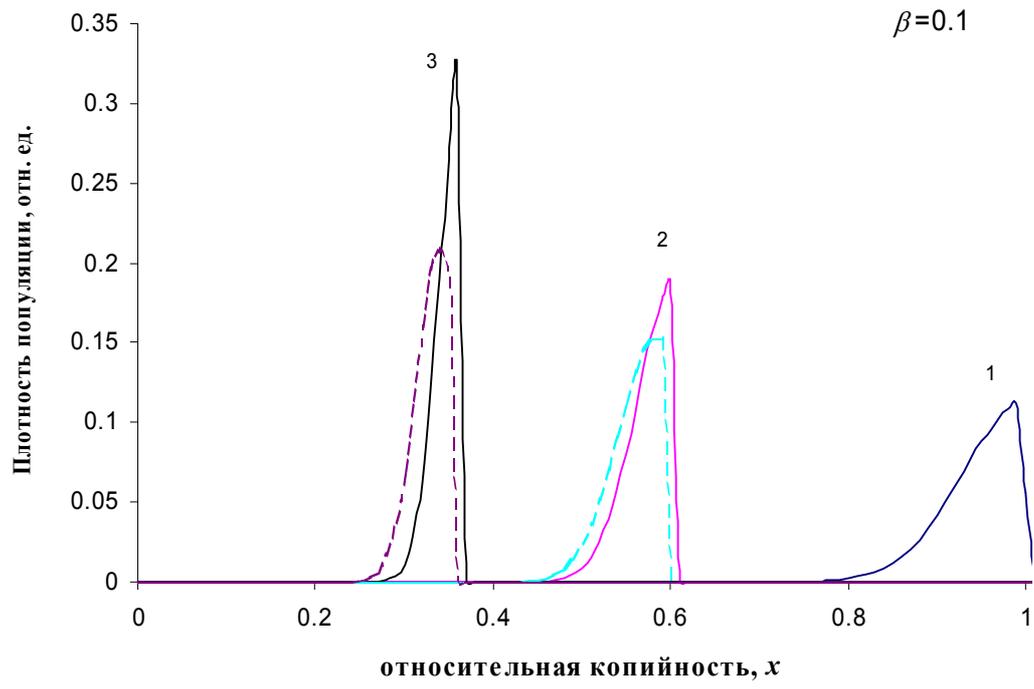


Рис 2

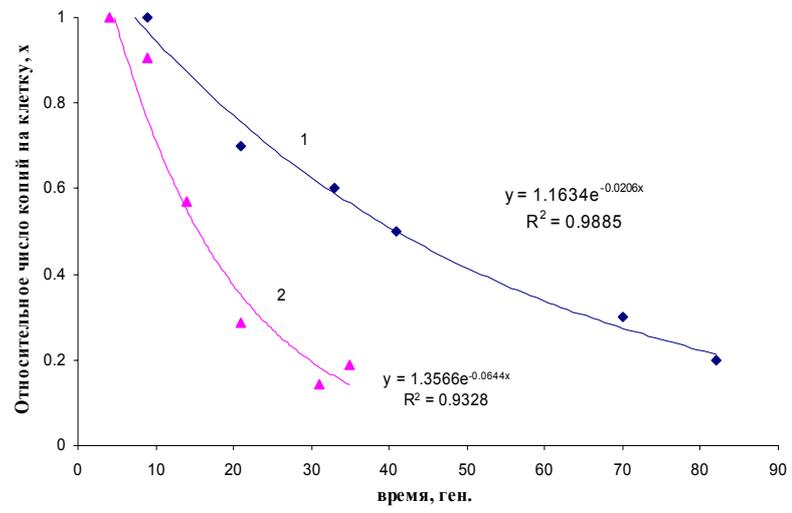


Рис 3

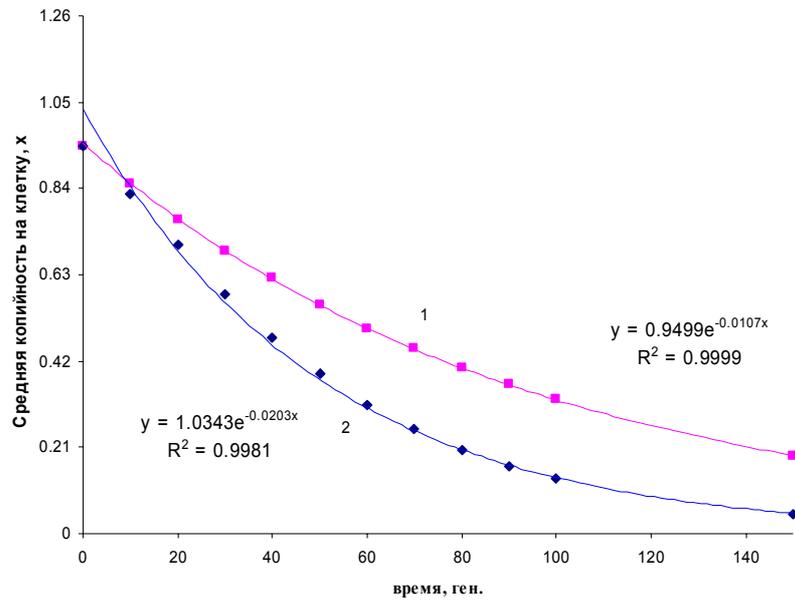


Рис. 4

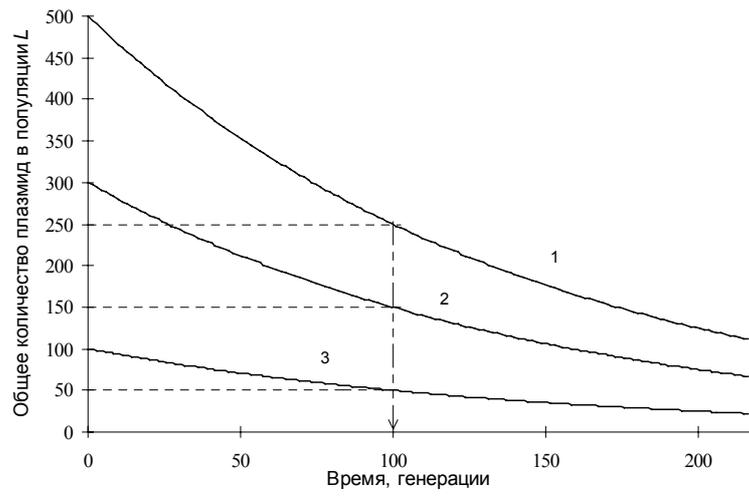


рис. 5

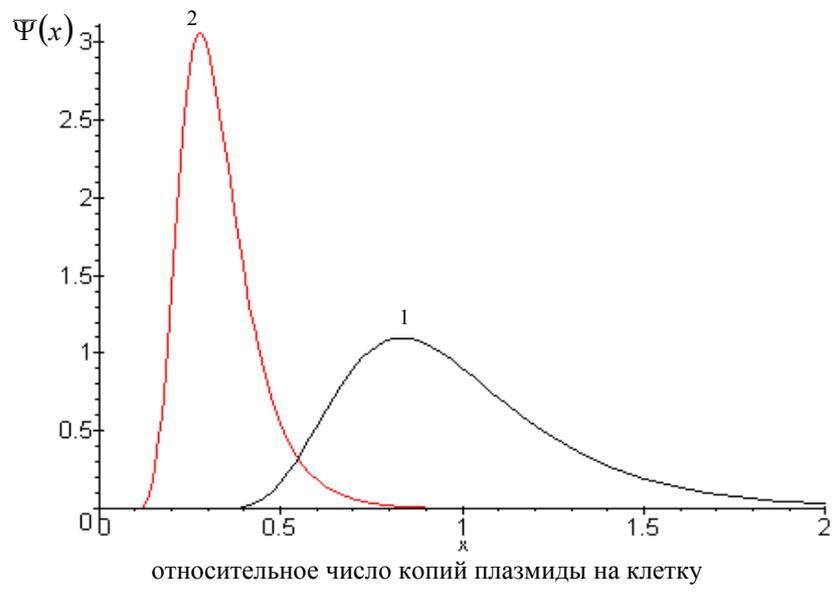


Рис. 6.

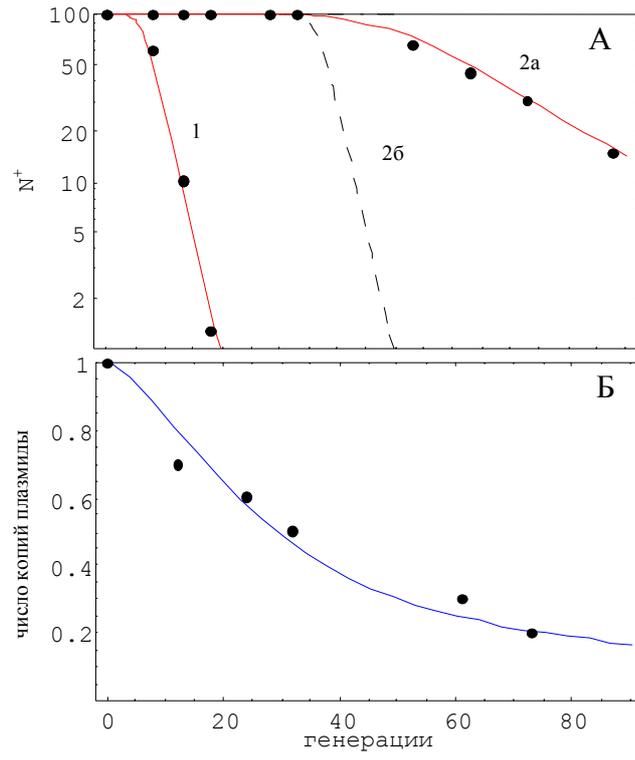


рис 7

Красноярский государственный университет, Красноярск, пр. Свободный, 79, 660041
Институт биофизики Сибирского Отделения РАН, Красноярск, 660036

Ганусов Виталий Владимирович: 660041, Красноярск, проспект Свободный, 79, Красноярский госуниверситет, физический факультет, кафедра биофизики. Тел.(3912) 44-08-41.

Адрес в настоящее время: Vitaly V. Ganusov, 1510 Clifton Rd., Biology department, Emory University, Atlanta, GA, USA, 30322. Email: vganuso@emory.edu, Vganusov@biology.emory.edu.

Брильков Анатолий Васильевич: 660036, Красноярск, Академгородок, Институт Биофизики СО РАН. Тел.(3912) 49-44-55. E-mail: bril@ibp.krasnoyarsk.su

Печуркин Николай Савельевич: 660036, Красноярск, Академгородок, Институт Биофизики СО РАН. Тел.(3912) 49-44-55.

Переписку адресовать Ганусову В.В. по адресу: Vitaly V. Ganusov, 1510 Clifton Rd., Biology department, Emory University, Atlanta, GA, USA, 30322. Email: vganuso@emory.edu, Vganusov@biology.emory.edu

РЕФЕРАТ

Ганусов В.В., Брильков А.В., Печуркин Н.С. Распределенная модель популяционной динамики бактериальных плазмид. //Математическое моделирование, 2000.

В работе разработана новая математическая модель, описывающая динамику распределения клеток микробной популяции с различным числом копий плазмид при непрерывном культивировании в хемостате. В приближении стационарного роста в непрерывной культуре получено, что снижение средней копийности в популяции бактерий является экспоненциальным, причем ненулевая “стоимость“ плазмиды приводит к большей скорости элиминации плазмид (тоже экспоненциальной). На основе модели предложена новая характеристика популяционной устойчивости рекомбинантных штаммов микроорганизмов – время полуэлиминации плазмид, определяемое временем генерации, скоростью потери плазмид и селективным коэффициентом. Впервые объяснен эффект снижения селективного преимущества бесплазмидных клеток при длительном культивировании рекомбинантного штамма в хемостате, связанного по модели со снижением среднего числа копий плазмиды в микробной популяции.

SPATIAL MODEL OF POPULATION DYNAMICS OF BACTERIAL PLASMIDS

Vitaly V. Ganusov¹, Anatoly V. Brilkov², Nicolay S. Pechurkin²

¹Krasnoyarsk State University, Krasnoyarsk, Svobodny 79.

²Institute of Biophysics Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Akademgorodok.

Email: ¹vganuso@emory.edu, ²bril@ibp.krasnoyarsk.su.

We suggest a new mathematical model of population dynamics of bacterial plasmids which accounts for the presence of several plasmid copies in a particular cell. We found that a decrease of the average number of plasmids in the population of bacteria is exponential with a rate that is lower than predicted by previous models. We developed model based characteristic that is a time of elimination of plasmids from the chemostat culture. The time is defined by the generation time in chemostat, the rate of plasmid loss and selection coefficient (“cost” of the plasmid). Model allowed us to explain the effect of decreasing the selection coefficient during prolonged cultivation of recombinant bacteria in chemostat connected (in the model) to the declining the average plasmid copy number in the microbe population.